201923065

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201923065 A

(43)公開日： 中華民國 108 (2019) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：107133835 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 09 月 26 日

(51)Int. Cl.： *C12M1/00 (2006.01)* *C12M3/00 (2006.01)*

(30)優先權：2017/09/26 日本 2017-185397

(71)申請人：日商日產化學股份有限公司 (日本) NISSAN CHEMICAL CORPORATION (JP)
日本

(72)發明人：広井佳臣 HIROI, YOSHIOMI (JP) ；鈴木康平 SUZUKI, KOHEI (JP) ；安部菜月 ABE, NATSUKI (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：9 項 圖式數：13 共 74 頁

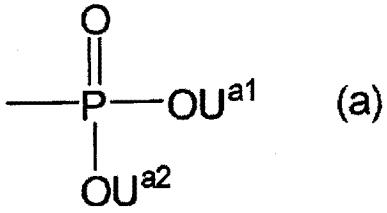
(54)名稱

具有微小容積之細胞培養容器

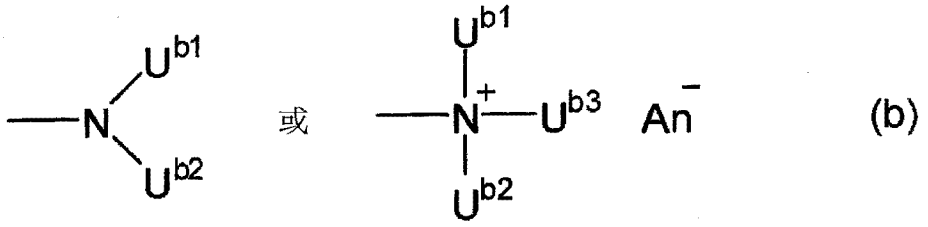
(57)摘要

本發明係關於一種細胞培養容器、其製造方法以及使用其之細胞凝集體(亦稱為細胞凝集塊)製造方法。本發明特別提供一種以表面塗覆具有細胞附著抑制能力之共聚物為特徵，具有微小容積(20μL 以下)之細胞培養容器及其製造方法。

本發明做成一種細胞培養容器，其在容器表面的至少一部份具備包含下述共聚物之塗覆膜，該共聚物含有包含以下述式(a)表示之基之重複單位與包含以下述式(b)表示之基之重複單位：



(a)



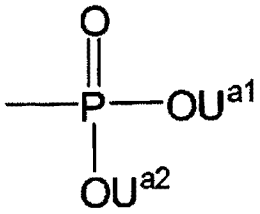
(b)

(式中，

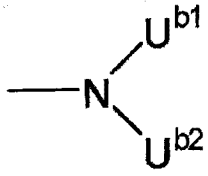
U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2} 以及 U^{b3} 各自獨立代表氫原子或碳原子數 1 至 5 的直鏈或支鏈烷基，An^-代表選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子以及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子)

，且形成該容器之容積為 20 μL 以下。

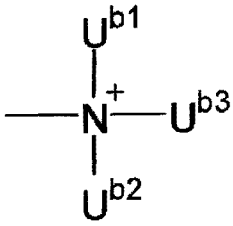
特徵化學式：



(a)



或



(b)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

具有微小容積之細胞培養容器

【技術領域】

【0001】本發明係關於細胞培養容器、其製造方法以及使用其之細胞凝集體(亦稱為細胞凝集塊)製造方法。本發明係特別關於一種以表面塗覆具有細胞附著抑制能力之共聚物為特徵之細胞培養容器及其製造方法。

【先前技術】

【0002】近年來，用以使在動物和植物體內扮演不同角色的各種器官、組織及細胞在活體外增殖或維持之技術正在發展。在活體外增殖或維持這些器官、組織分別稱為器官培養、組織培養，在活體外增殖、分化或維持分離自器官、組織之細胞稱為細胞培養。細胞培養為於活體外，在培養基中增殖、分化或維持分離出之細胞的技術，且為用以詳細解析活體內各種器官、組織、細胞之功能及構造所不可或缺的技術。此外，經由該技術而培養出的細胞及/或組織被利用於化學物質、醫藥品等之藥效及毒性評價、或酵素、細胞生長因子、抗體等有用物質之大量生長、修補因疾病或缺損而失去之器官、組織、細胞之再生醫療、植物之品種改良、基因重組作物的製作等的各種領域。

【0003】來自動物之細胞依其性狀而被大致二分為懸浮細胞與貼壁細胞。懸浮細胞為生長・增殖時不需立足點的細胞，貼壁細胞為生長・增殖時需要立足點的細胞，而構成活體的大部分細胞為後者貼壁細胞。作為貼壁細胞的培養方法，已知有單層培養、分散培養、包埋培養、微載體培養及細胞凝集體(細胞凝集塊)培養等。

【0004】特別是近年來，隨著再生醫療領域的發展，細胞凝集塊培養作為一種在更接近活體內的環境下的培養方法而受到矚目，且有各種適合該培養之培養基組成物、培養基添加劑等被報告(例如參照專利文獻1及2)。此外，來自培養容器(基材)的刺激被認為是左右細胞凝集塊培養中培養結果的重要要因，需要在沒有來自培養容器的刺激下、在三次元環境或完全懸浮狀態下培養細胞(特別是細胞凝集體)(例如參照專利文獻3)。

【0005】本發明者群注意到具有各種活體物質之附著抑制能力、作為塗覆材料而受到期待之具有磷酸酯基之聚合物，並進行反覆研究。其結果報告如下：表面的至少一部分被塗覆包含特定陰離子性基與陽離子性基之共聚物之細胞培養容器，可抑制細胞附著至容器表面(內部表面)，同時塗層可強力固著於容器表面，因此做為塗層溶出至培養液和放射線耐受性獲得改善之細胞培養容器是有用的(例如參照專利文獻4)。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0006】

[專利文獻1]國際公開第2014/017513號公報

[專利文獻2]國際公開第2013/144372號公報

[專利文獻3]日本特開2008-61609號公報

[專利文獻4]國際公開第2014/0196652號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0007】以往，為了在三次元環境或完全懸浮狀態下培養細胞(特別是細胞凝集體)，存在細胞附著至容器表面及細胞培養容器所附之塗層溶出至培養液的問題。而且，還存在經細胞培養而生產・分泌/培養基中所包含之蛋白質附著至容器表面的問題。經親水性化合物塗覆之細胞培養容器雖可改善容器表面的細胞附著，但仍然存在細胞培養容器所附之塗層溶出至培養液和蛋白質附著至容器表面等的問題。

【0008】此外，在細胞培養容器為具有微小空間之容器(具有多個凹陷之細胞培養皿等)的情況下，一般具有活體物質附著抑制能力的塗覆劑在進行塗佈等以形成膜時，有膜中殘存氣泡，所謂起泡的問題。這對細胞培養容器品質(細胞黏附性、蛋白質黏附性、光學測定等)的安定化造成壞影響。

【0009】因此，本發明以提供一種細胞培養容器、其製造方法以及使用其之細胞凝集體製造方法為目的。本發

明特別以提供一種以表面無起泡等缺點、膜厚均勻地塗覆具有細胞附著抑制能力之共聚物為特徵之細胞培養容器、其製造方法以及使用其之細胞凝集體製造方法為目的。

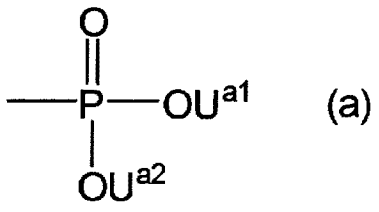
[用以解決課題之手段]

【0010】本發明者群為了達成上述課題進行了潛心研究，結果發現表面的至少一部分被塗覆除了包含特定陰離子性基與陽離子性基還包含特定疏水性基之共聚物之細胞培養容器，除了抑制細胞附著至容器表面，還抑制蛋白質附著至容器表面，同時塗層強力固著於容器表面，而且可製造即使是具有微小空間之細胞培養容器，其表面仍形成無起泡等缺點並有均勻的膜厚，無缺陷等缺點之塗層的細胞培養容器，並完成本發明。

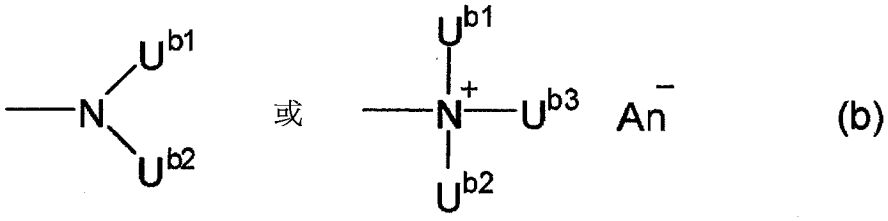
【0011】即，本發明如下所述：

[1]一種細胞培養容器，其容器表面具有至少一個容積為20 μL以下之開口的微小空間，而且其在構成該微小空間之容器的表面部分的至少一部份具備包含下述共聚物之塗覆膜，該共聚物含有包含以下述式(a)表示之基之重複單位與包含以下述式(b)表示之基之重複單位：

【化1】



(a)



(b)

(式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}各自獨立代表氫原子或碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基，An^-代表選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子以及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子)。

【0012】[2]如第1項之細胞培養容器，其中上述共聚物更進一步含有包含以下述式(c)：

【化2】



(c)

[式中，

R^c代表碳原子數1至18之直鏈或支鏈烷基、碳原子數3至10之環式烴基、碳原子數6至10之芳基、碳原子數7至15之芳烷基或碳原子數7至15之芳氧烷基(於此，前述芳基部分亦可被可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈

烷基取代)]表示之基之重複單位。

【0013】[3]如[1]或[2]之細胞培養容器，其中上述塗覆膜的最大膜厚與最小膜厚之差為1000Å以下。

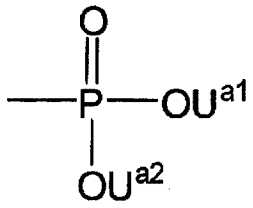
【0014】[4]如[1]~[3]中任一項之細胞培養容器，其為細胞凝集體製造用。

【0015】[5]如[1]~[4]中任一項之細胞培養容器，其中上述塗覆膜表面在大氣中的水接觸角為0~120°，或者是在水中的氣泡接觸角為80~180°。

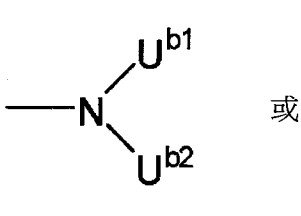
【0016】[6]一種製造方法，其為一種包含下述步驟之細胞培養容器製造方法：使塗覆劑接觸具有至少一個容積為20 μL以下之開口微小空間的細胞培養容器表面，並在構成該微小空間之容器表面部分的至少一部分形成最大膜厚與最小膜厚之差為1000Å以下之塗覆膜的步驟，

且上述塗覆劑包含下述共聚物，該共聚物含有包含以下述式(a)表示之基之重複單位與包含以下述化學式(b)表示之基之重複單位：

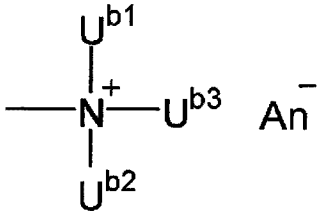
【化3】



(a)



或



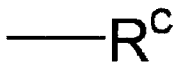
(b)

(式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}各自獨立代表氫原子或碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基，An^-代表選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子以及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子)。

【0017】[7]如[6]之細胞培養容器製造方法，其中上述共聚物更進一步含有包含以下述式(c)：

【化4】



(c)

[式中，

R^c代表碳原子數1至18之直鏈或支鏈烷基、碳原子數3至10之環式烴基、碳原子數6至10之芳基、碳原子數7至15之芳烷基或碳原子數7至15之芳氧烷基(於此，前述芳基部分亦可被可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基取代)]表示之基之重複單位。

【0018】[8]如[1]~[5]中任一項之細胞培養容器，其可見光區域的穿透率為90%以上。

【0019】[9]如[1]~[5]中任一項之細胞培養容器，其材質為玻璃、含金屬化合物、含半金屬化合物或樹脂。

[發明之效果]

【0020】本發明之細胞培養容器經由表面的至少一部分被塗覆包含以式(a)表示之陰離子、式(b)表示之陽離子、式(c)表示之疏水性基之共聚物，而可抑制細胞或蛋白質附著至容器表面。推測經由該陽離子及陰離子靜電的平衡，使容器表面保持電中性，而可防止細胞或蛋白質附著至容器表面。另一方面，藉由塗層中的該陽離子及陰離子形成離子鍵(離子複合體)，而可固著於玻璃、纖維、無機粒子或樹脂(合成樹脂及天然樹脂)等任何容器基材的種類，並且在固著後成為對水系溶劑(水、磷酸緩衝液(PBS)、酒精等)耐久性優異之塗層。此外，可製造即使是具有微小空間之細胞培養器，容器表面仍形成無起泡等缺點並均勻的塗覆膜之細胞培養容器。

【0021】本發明之細胞培養容器在表面的至少一部分具備最大膜厚與最小膜厚之差為1000Å以下，以300Å以下為佳之一種包含具有活體物質附著抑制能力之聚合物、特定陰離子構造與特定陽離子構造之共聚物的塗覆膜。塗覆膜具有優異的活體物質附著抑制能力。而且，可藉由簡便的操作在玻璃、含金屬化合物或含半金屬化合物、活性碳

或樹脂等各種材料上賦予塗覆膜。而且，在某些情況下可藉由將疏水性基導入前述共聚物，而賦予對塑膠等樹脂之密著性佳，並對固著後之水系溶劑耐久性更優異之塗覆膜。

【0022】此外，本發明之細胞培養容器即使由互相接觸的至少兩個平面所構成，且包含兩個平面相交的角度為$0<\theta<180°$之結構部分，塗覆劑仍不會在該結構部分的邊緣部分和底面聚積而使邊緣部分和底面的厚度顯著增加，而可具備最大膜厚與最小膜厚之差為1000Å以下，以300Å以下為佳之保角塗覆膜。而且，具備最大膜厚與最小膜厚之差為1000Å以下，以300Å以下為佳之均勻保角塗覆膜的微孔培養板不僅從具有充分的活體物質附著抑制能力的觀點來看是有用的，而且膜厚在一般平板讀數儀之測定波長(例如340~850mm)以下，因此從不影響光學測定的觀點來看也是有用的。

【圖式簡單說明】

【0023】

[圖1]以倒立型顯微鏡觀察(表1)中陰性對照(Corning #3893)之結果的照片。

[圖2]以倒立型顯微鏡觀察(表1)中實施例1(Corning #3893)之結果的照片。

[圖3]以倒立型顯微鏡觀察(表1)中比較例1(Corning #3893)之結果的照片。

[圖4]以倒立型顯微鏡觀察(表1)中陰性對照(Greiner #782180)之結果的照片。

[圖5]以倒立型顯微鏡觀察(表1)中實施例1(Greiner #782180)之結果的照片。

[圖6]以倒立型顯微鏡觀察(表1)中比較例1(Greiner #782180)之結果的照片。

[圖7]PDMS塗覆培養板之製作說明圖(1)。

[圖8]PDMS塗覆培養板之製作說明圖(2)。

[圖9]PDMS塗覆培養板之製作說明圖(3)。

[圖10]以倒立型顯微鏡觀察(表2)中陰性對照之結果的照片。

[圖11]以倒立型顯微鏡觀察(表2)中實施例2之結果的照片。

[圖12]以倒立型顯微鏡觀察(表2)中比較例2之結果的照片。

[圖13]以倒立型顯微鏡觀察(表2)中比較例2之結果的照片。

【實施方式】

【0024】

1.用語的說明

本發明中所使用的用語，只要沒有特別聲明，具有以下之定義。

【0025】於本發明，「鹵素原子」代表氟原子、氯原

子、溴原子或碘原子。

【0026】於本發明，「烷基」代表直鏈或支鏈飽和脂肪烴之一價基。作為「碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基」，例如可舉出甲基、乙基、n-丙基、異丙基、n-丁基、異丁基、s-丁基、t-丁基、n-戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基或1-乙基丙基。作為「碳原子數1至18的直鏈或支鏈烷基」，除可舉出上述碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基之例，還可舉出己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四基、十五烷基、十六烷基、十七烷基或十八烷基、或者是彼等之異構物。

【0027】於本發明，「可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基」代表上述碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基，或者是經1個以上之上述鹵素原子取代之上述碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基。「碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基」之例，如上所述。另一方面，「經1個以上之鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基」，代表上述碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基之一個以上的任何氫原子被鹵素原子所取代者，作為例子可舉出氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、溴甲基、碘甲基、2,2,2-三氟乙基、2,2,2-三氯乙基、全氟乙基、全氟丁基或全氟戊基等。

【0028】於本發明，「酯鍵」代表-C(=O)-O-或

-O-C(=O)-，「醯胺鍵」代表-NHC(=O)-或-C(=O)NH-，「醚鍵」代表-O-。

【0029】於本發明，「可經鹵素原子取代之碳原子數1至10之直鏈或支鏈伸烷基」代表碳原子數1至10的直鏈或支鏈伸烷基，或者是經1個以上之鹵素原子取代之碳原子數1至10之直鏈或支鏈伸烷基。於此，「伸烷基」代表對應於上述烷基之2價有機基。作為「碳原子數1至10之直鏈或支鏈伸烷基」之例，可舉出伸甲基、伸乙基、伸丙基、三伸甲基、四伸甲基、1-甲基伸丙基、2-甲基伸丙基、二甲基伸乙基、乙基伸乙基、五伸甲基、1-甲基-四伸甲基、2-甲基-四伸甲基、1,1-二甲基-三伸甲基、1,2-二甲基-三伸甲基、2,2-二甲基-三伸甲基、1-乙基-三伸甲基、六伸甲基、八伸甲基及十伸甲基等，此等之中，以伸乙基、伸丙基、八伸甲基及十伸甲基為佳，例如以伸乙基、伸丙基、三伸甲基、四伸甲基等碳原子數1至5之直鏈或者支鏈伸烷基為較佳，以伸乙基或伸丙基為特佳。「經1個以上之鹵素原子取代之碳原子數1至10之直鏈或支鏈伸烷基」，代表上述伸烷基之一個以上的任何氫原子被鹵素原子所取代者，並以伸乙基或伸丙基之一部分或全部氫原子被鹵素原子取代者為特佳。

【0030】於本發明，「碳原子數3至10之脂環式烴基」代表碳原子數3至10，單環式或多環式，飽和或部分不飽和脂肪族烴之一價基。其中又以碳原子數3至10，單環式或二環式，飽和脂肪族烴之一價基為佳，例如可舉出

環丙基、環丁基或環己基等碳原子數3至10之環烷基、或二環[3．2．1]辛基、冰片基、異冰片基等碳原子數4至10之二環烷基。

【0031】於本發明，「碳原子數6至10之芳基」代表碳原子數6至10，單環式或多環式芳香族烴之一價基，例如可舉出苯基、萘基或蒽基等。「碳原子數6至10之芳基」亦可被一個以上之上述「可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基」所取代。

【0032】於本發明，「碳原子數7至15之芳烷基」代表基-R-R’(於此，R代表上述「碳原子數1至5之伸烷基」，R’代表上述「碳原子數6至10之芳基」)，例如可舉出苄基、苯乙基或α-甲基苄基等。「碳原子數7至15之芳烷基」的芳基部分亦可被一個以上之上述「可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基」所取代。

【0033】於本發明，「碳原子數7至15之芳氧烷基」代表基-R-O-R’(於此，R代表上述「碳原子數1至5之伸烷基」，R’代表上述「碳原子數6至10之芳基」)，例如可舉出苯氧基甲基、苯氧基乙基或苯氧基丙基等。「碳原子數7至15之芳氧烷基」的芳基部分亦可被一個以上之上述「可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基」所取代。

【0034】於本發明，所謂「鹵化物離子」代表氟化物離子、氯化物離子、溴化物離子或碘化物離子。

【0035】於本發明，所謂「無機酸離子」，代表碳酸

離子、硫酸離子、磷酸離子、磷酸氫離子、磷酸二氫離子、硝酸離子、過氯酸離子或硼酸離子。

【0036】作為上述An^-，以鹵化物離子、硫酸離子、磷酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸鹽離子為佳，以鹵化物離子為特佳。

【0037】於本發明，所謂(甲基)丙烯酸酯化合物代表丙烯酸酯化合物與甲基丙烯酸酯化合物兩方。例如(甲基)丙烯酸代表丙烯酸與甲基丙烯酸。

此外，於本發明，所謂「陰離子」或「陰離子性基」代表陰離子或陰離子性基，並亦包含可在水中解離成為陰離子或陰離子性基者。同樣地，於本發明，所謂「陽離子」或「陽離子性基」代表陽離子或陽離子性基，並亦包含可在水中解離成為陽離子或陽離子性基者。

【0038】所謂具有細胞附著抑制能力，例如，代表藉由以實施例中記載之方法進行的細胞數測定試藥，在與無塗層比較時的相對吸光度(WST O · D · 450nm)(%)(實施例之吸光度(WST O · D · 450nm)/比較例之吸光度(WST O · D · 450nm)×100)為50%以下，以30%以下為佳，以20%以下為更佳。

【0039】所謂具有蛋白質附著抑制能力，例如，代表藉由以實施例中記載之方法進行QCM測定，在與無塗覆膜比較時的每相對單位面積之質量(%)(實施例之每相對單位面積之質量(ng/cm^2)/比較例之每相對單位面積之質量(ng/cm^2)×100)為50%以下，以30%以下為佳，以20%以下

為更佳。

【0040】於本發明，作為蛋白質可舉出纖維蛋白原、牛血清白蛋白(BSA)、人類白蛋白、各種球蛋白、β-脂蛋白、各種抗體(IgG、IgA、IgM)、過氧化酶、各種補體、各種凝集素、纖維黏聯蛋白、溶菌酶、血管性血友病因子(vWF)、血清γ-球蛋白、胃蛋白酶、卵白白蛋白、胰島素、組蛋白、核糖核酸酶、膠原蛋白、細胞色素c等，特別對於血清中所包含之蛋白質(白蛋白及球蛋白)具有特別高的附著抑制能力。

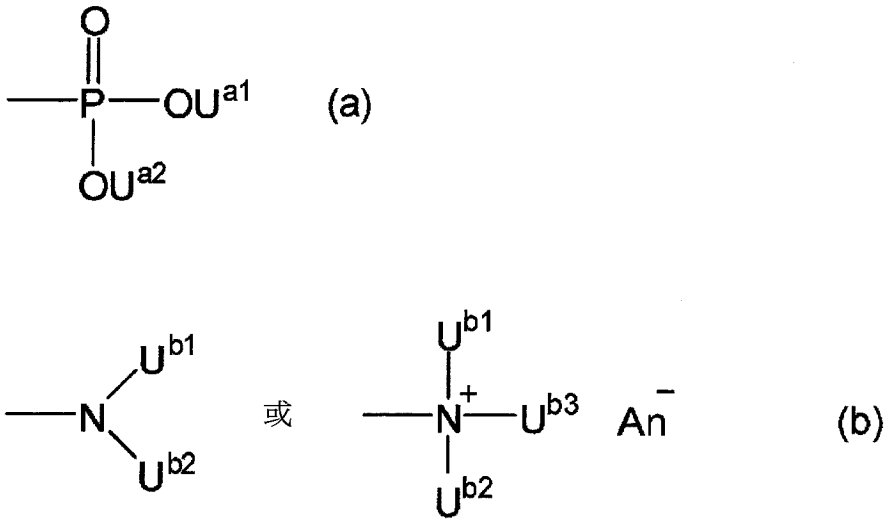
【0041】

2.本發明之說明

<<細胞培養容器>>

本發明之第一態樣為一種細胞培養容器，其容器表面具有至少一個容積為20 μL以下之開口微小空間，而且其在構成該微小空間之容器表面部分的至少一部份具備包含下述共聚物之塗覆膜，該共聚物含有包含以下述式(a)表示之基之重複單位與包含以下述式(b)表示之基之重複單位：

【化5】



(式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}各自獨立代表氫原子或碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基，An^-代表選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子以及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子)。

【0042】以上述共聚物更進一步含有包含以下述式(c)：

【化6】



[式中，

R^c代表碳原子數1至18之直鏈或支鏈烷基、碳原子數3至10之環式烴基、碳原子數6至10之芳基、碳原子數7至15之芳烷基或碳原子數7至15之芳氧烷基(於此，前述芳基部分亦可被可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈

烷基取代)]表示之基之重複單位的細胞培養容器為佳。

【0043】

<細胞>

於本發明，所謂細胞為構成動物或植物的最基本單位，其為在細胞膜的內部具有細胞質與各種細胞小器官作為其要素者。在此情況下，內含DNA之核可被包含於細胞內部亦可不被包含於細胞內部。例如，本發明中來自動物之細胞中包含精子和卵子等的生殖細胞、構成活體之體細胞、幹細胞(多功能性幹細胞等)、前驅細胞、自活體分離出之癌細胞、自活體分離出且獲得無限增殖能而在體外安定維持之細胞(細胞株)、自活體分離出且經人工基因改變而成之細胞、自活體分離出且經人工核交換之細胞等。作為構成活體之體細胞之例，雖不限定於以下體細胞，但包含纖維母細胞、骨髓細胞、B淋巴球、T淋巴球、嗜中性球、紅血球、血小板、巨噬細胞、單核球、骨細胞、骨髓細胞、外膜細胞、樹狀細胞、角質細胞、脂肪細胞、間葉細胞、上皮細胞、表皮細胞、內皮細胞、血管內皮細胞、肝細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神經系細胞、神經膠質細胞、神經元、神經間膠細胞、小神經膠質細胞、星狀膠細胞、心臟細胞、食道細胞、肌肉細胞(例如平滑肌細胞或骨骼肌細胞)、胰臟β細胞、黑色素細胞、造血前驅細胞(例如來自臍帶血之CD34陽性細胞)以及單核細胞等。該體細胞包含採自例如皮膚、腎臟、脾臟、腎上腺、肝臟、肺、卵巢、胰臟、子宮、胃、結腸、小腸、大腸、膀胱、

前列腺、睾丸、胸腺、肌肉、結締組織、骨、軟骨、血管組織、血液(包含臍帶血)、骨髓、心臟、眼、腦或神經組織等的任意組織之細胞。所謂幹細胞，為兼具複製自己本身之能力與分化為其他複數系統的細胞之能力的細胞，作為該例，雖不限定於以下幹細胞，但包含胚胎幹細胞(ES細胞)、胚胎腫瘤細胞、胚胎生殖幹細胞、人工多功能性幹細胞(iPS細胞)、神經幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、胰幹細胞、肌肉幹細胞、生殖幹細胞、腸幹細胞、癌幹細胞、毛囊幹細胞等。作為多功能性幹細胞，前述幹細胞中可舉出ES細胞、胚胎生殖幹細胞、iPS細胞。所謂前驅細胞，為處於由前述幹細胞分化為特定體細胞或生殖細胞之途中階段的細胞。所謂癌細胞，為自體細胞衍生並獲得無限增殖能力之細胞。所謂細胞株，為經由活體外人工操作而獲得無限增值能力之細胞。

【0044】作為癌細胞株之例，雖不限定於以下癌細胞株，但作為人類乳癌細胞株可舉出HBC-4、BSY-1、BSY-2、MCF-7、MCF-7/ADR RES、HS578T、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-N、BT-549、T47D、作為人類子宮頸癌細胞株可舉出HeLa、作為人類肺癌細胞株可舉出A549、EKVX、HOP-62、HOP-92、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H322M、NCI-H460、NCI-H522、DMS273、DMS114、作為人類大腸癌細胞株可舉出Caco-2、COLO-205、HCC-2998、HCT-15、HCT-116、HT-29、KM-12、SW-620、WiDr、作為人類前列腺癌細胞株可舉出DU-

145、PC-3、LNCap、作為人類中樞神經系癌細胞株可舉出U251、SF-295、SF-539、SF-268、SNB-75、SNB-78、SNB-19、作為人類卵巢癌細胞株可舉出OVCAR-3、OVCAR-4、OVCAR-5、OVCAR-8、SK-OV-3、IGROV-1、作為人類腎癌細胞株可舉出RXF-631L、ACHN、UO-31、SN-12C、A498、CAKI-1、RXF-393L、786-0、TK-10、作為人類胃癌細胞株可舉出MKN45、MKN28、St-4、MKN-1、MKN-7、MKN-74、作為皮膚癌細胞株可舉出LOX-IMVI、LOX、MALME-3M、SK-MEL-2、SK-MEL-5、SK-MEL-28、UACC-62、UACC-257、M14、作為白血病細胞株可舉出CCRF-CRM、K562、MOLT-4、HL-60TB、RPMI8226、SR、UT7/TPO、Jurkat等。作為細胞株之例，雖不限定於以下細胞株，但包含HEK293(人類胎兒腎細胞)、MDCK、MDBK、BHK、C-33A、AE-1、3D9、Ns0/1、NIH3T3、PC12、S2、Sf9、Sf21、High Five(註冊商標)、Vero等。作為肝細胞株之例，雖不限定於以下細胞株，但可舉出HepG2、Hep3B、HepaRG(註冊商標)、JHH7、HLF、HLE、PLC/PRF/5、WRL68、HB611、SK-HEP-1、HuH-4、HuH-7等。

【0045】本發明中來自植物之細胞包含分離自植物體各組織之細胞，亦包含以人工方式將細胞壁自該細胞去除後之原生質體。

【0046】

<容器>

構成本發明之細胞培養容器的塗覆有共聚物之容器，只要是可在本技術領域使用之任意型態的容器類即可，例如可舉出一般被用於細胞培養之培養皿、組織培養用培養皿、多功能皿等的培養皿/培養盤類、細胞培養燒瓶、攪拌式培養瓶等的燒瓶類、塑膠袋、鐵氟龍(註冊商標)袋、培養袋等的袋類、多功能皿/多片式盤、微平板/微孔培養板、深孔培養板等的多孔培養板類、室載玻片等的載玻片及其相關製品、培養管、離心管、微量離心管等的管類、盤、滾瓶等。可舉出以6~1536孔之多孔培養板及培養皿/培養盤為佳。

【0047】本發明之容器在其表面具有一個以上之開口微小空間。該微小空間，例如，代表被設於培養板、培養皿/培養盤等的任意形狀之孔(穴)或凹穴(凹陷)，其容積為每一個微小空間20μL以下，以0.1~20μL為佳，典型來說為5~20μL。作為用途，例如被使用於細胞凝集體的製造。具體來說，可舉出用以大量製造細胞凝集體之每一孔(每一穴)容積5~20μL的1536穴之多孔培養板、凹穴培養盤、市售之細胞大量培養用培養板。

【0048】例如，上述培養板(細胞培養器)培養細胞的微小空間被連續排列配置(例如參照圖7、圖8)，通常的塗佈型塗覆膜會產生起泡、膜厚不平均等的問題。本發明之細胞培養容器不發生塗覆膜起泡，並在容器表面的至少一部份具備膜厚平均之塗覆膜。

【0049】容器可為上部開放者(典型來說為培養盤、

培養皿等)，亦可為密封者(燒瓶、袋)，但從塗佈本發明之塗覆劑考慮，典型來說以上部開放之細胞培養容器較為合適。

【0050】於此，前述細胞培養容器具有之微小空間(孔、凹穴等)的形狀可為略半球狀、略長方體狀或略圓柱狀等，其底面可為平底亦可為圓底。例如，在各孔形狀為略長方體狀或略圓柱狀的情況下，前述「互相接觸的至少兩個平面」為孔之底面內部表面與壁面內部表面，前述「兩個平面相交的角度θ」，代表各孔之底面內部表面與壁面內部表面所構成的角度。而且在底面為圓底的情況下，前述「底面內部表面」可被圓底的最底部之切平面取代。此外在各孔之形狀為略半球狀的情況下，前述「互相接觸的至少兩個平面」可被半球狀孔的最底部之切平面與從最底部至端部為止之弧的中點之切平面取代，前述「兩個平面相交的角度θ」，代表前述兩個切平面所構成的角度。

【0051】作為容器的素材，典型來說，可使用玻璃或樹脂。從加工容易性和經濟性等的觀點來看，以使用樹脂為佳。樹脂可為天然樹脂或合成樹脂的任何一者，作為天然樹脂，例如可舉出纖維素、三乙酸纖維素(CTA)、將硫酸葡聚糖固定化之纖維素等，作為合成樹脂，例如可舉出聚丙烯腈(PAN)、聚酯系聚合物合金(PEPA)、聚苯乙烯(PS)、聚碸(PSF)、聚對苯二甲酸乙二酯(PET)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚乙烯醇(PVA)、聚胺基甲酸酯(PU)、

乙烯-乙烯醇(EVAL)、聚乙烯(PE)、聚酯、聚丙烯(PP)、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚醚碸(PES)、聚碳酸酯(PC)、聚氯乙烯(PVC)、聚四氟乙烯(PTFE)、超高分子量聚乙烯(UHPE)、聚二甲基矽氧烷(PDMS)、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯樹脂(ABS)、鐵氟龍(註冊商標)、環烯烴聚合物(COP)(例如，ZEONOR(註冊商標)、ZEONEX(註冊商標)(日本ZEON CORPORATION(股)製))或者是各種離子交換樹脂或等。在本發明之細胞培養容器的製造之中，在塗覆共聚物以存在於該容器表面的至少一部份時，由於不需要高溫下的處理，所以耐熱性低的樹脂等亦可適用。

【0052】作為本發明之容器的素材，亦可使用含金屬化合物或含半金屬化合物。金屬，可舉出典型金屬：(鹼金屬：Li、Na、K、Rb、Cs；鹼土類金屬：Ca、Sr、Ba、Ra)、鎂族元素：Be、Mg、Zn、Cd、Hg；鋁族元素：Al、Ga、In；希土類元素：Y、La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu；錫族元素：Ti、Zr、Sn、Hf、Pb、Th；鐵族元素：Fe、Co、Ni；土酸元素：V、Nb、Ta、鉻族元素：Cr、Mo、W、U；錳族元素：Mn、Re；貴金屬：Cu、Ag、Au；鉑族元素：Ru、Rh、Pd、Os、Ir、Pt等。含金屬化合物或含半金屬化合物，例如可舉出基本成分為金屬氧化物，並經由高溫下的熱處理而燒結固定之燒結體如陶瓷、矽之半導體、金屬氧化物或半金屬氧化物(矽氧化物、氧化鋁等)、金屬碳化物或半金屬碳化物、金屬氮化物或半金屬氮化物(矽氮化物等)、金屬硼化物或半金屬硼化物等

的無機化合物之成形體等無機固體材料、鋁、鎳鈦、不鏽鋼(SUS304、SUS316、SUS316L等)。

【0053】本發明之細胞培養容器在構成該微小空間之容器表面部分的至少一部分具備最大膜厚與最小膜厚之差為1000Å以下，以300Å以下為佳、以100Å以下為較佳之塗覆膜。

【0054】上述細胞培養容器由互相接觸的至少兩個平面所構成，且可包含兩個平面相交的角度θ為0<θ<180°，以30°<θ<150°為佳，以70°<θ<110°為較佳之結構部分。而且，平面的單方或雙方的一部份或全部可為曲面。以傳統技術塗覆具有這種結構部分之細胞培養容器時，會發生塗覆劑在具有上述角度θ的邊緣部分和底面聚積的缺點，但藉由在塗覆膜中特別含有一種包含以上述式(a)表示之基之重複單位與包含以上述式(b)表示之基之重複單位，與視情況含有包含以上述式(c)表示之基之重複單位的共聚物，而可迴避這種缺點。

【0055】本發明之塗覆膜亦可適用於實驗機器類、分析機器類或者醫療機器類。特別是，亦可為在實驗機器類、分析機器類或者醫療機器類中與活體內組織和血液接觸使用之機器的全體或者是其至少一部分之結構物。作為實驗機器類之例，可舉出上述細胞培養容器。作為醫療機器類之例，可舉出體內埋入型之人工器官或治療器具、體外循環型之人工臟器類、導管、軟管、人工瓣膜、支架、人工關節等的全體或者是其至少一部分之結構物。

【0056】特別是，作為光學測定用基體，只要是用以供試於光學測定之基體(基材)即無特殊限制，但例如除了上述構造基體且用以供試於光學測定(測定波長例如為340~850nm)者之外，還可舉出例如被使用於平板讀數儀之基體(基材)(細胞培養培養板等)、位相差顯微鏡用培養板、UV測定用比色槽、透明電極(ITO電極)等。

【0057】本發明之細胞培養容器，具備塗覆膜之微小空間的可見光區域透光率以90%以上為理想，以92%以上為佳，以95%以上為佳，以98%以上為最佳。

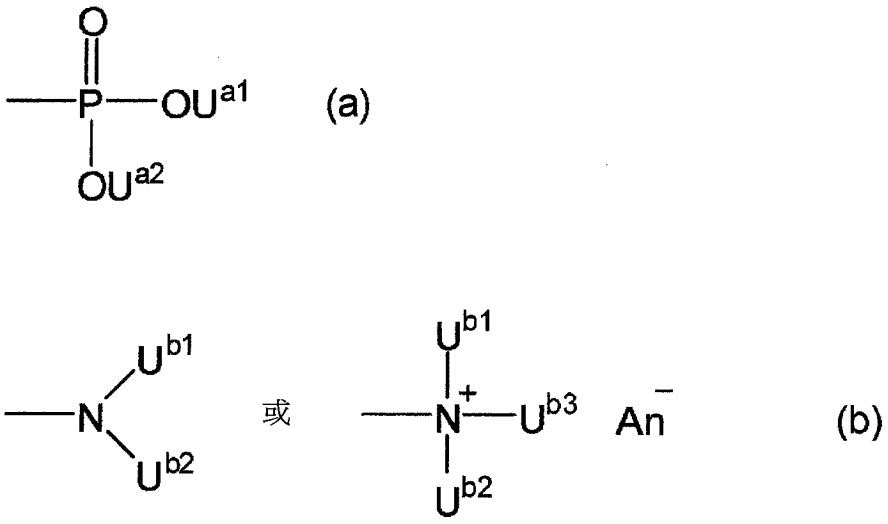
【0058】

<共聚物>

本發明之細胞培養容器，在容器表面具有至少一個容積為20 μL以下之開口的微小空間，而且其特徵為構成該微小空間之容器的表面部分的至少一部份被塗覆特定共聚物。本發明之共聚物為，

含有包含以下述式(a)表示之基之重複單位與包含以下述式(b)表示之基之重複單位之共聚物：

【化7】



(式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}各自獨立代表氫原子或碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基，An^-代表選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子以及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子)。

【0059】

上述共聚物亦可更進一步含有包含以下述式(c)：

【化8】



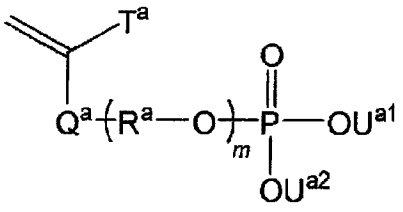
[式中，

R^c代表碳原子數1至18之直鏈或支鏈烷基、碳原子數3至10之環式烴基、碳原子數6至10之芳基、碳原子數7至15之芳烷基或碳原子數7至15之芳氧烷基(於此，前述芳基部分亦可被可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基取代)]表示之基之重複單位。

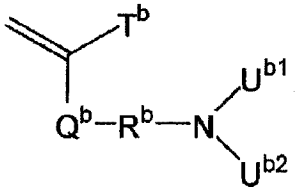
【0060】本發明之共聚物，只要是含有以下重複單位之共聚物即無特殊限制：包含以上述式(a)表示之基之重複單位、包含以上述式(b)表示之基之重複單位，以更進一步含有包含以上述式(c)表示之基之重複單位為佳。再者，於本發明，包含以上述式(c)表示之基之重複單位異於包含以上述式(a)表示之基之重複單位及包含以上述式(b)表示之基之重複單位。該共聚物以將包含以上述式(a)表示之基之單體、包含以上述式(b)表示之基之單體、包含以上述式(c)表示之基之單體進行自由基聚合而得者為理想，但亦可使用經聚縮合、加成聚合反應而成者。作為共聚物之例，雖可舉出如烯烴反應而成之乙烯基聚合聚合物、聚醯胺、聚酯、聚碳酸酯、聚胺基甲酸酯等，但此等之中尤以烯烴反應而成之乙烯基聚合聚合物或使(甲基)丙烯酸酯化合物聚合而成之(甲基)丙烯酸聚合物為特別理想。

【0061】包含以上述式(a)、(b)及(c)表示之基之單體，以分別為以下述式(A)、(B)及(C)表示之單體為佳：

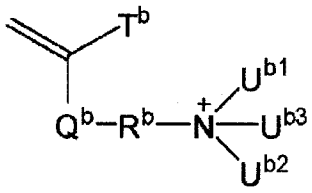
【化9】



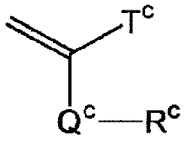
(A)



或



(B)



(C)

[式中，

T^a、T^b、T^c、U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}各自獨立代表氫原子或碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基；

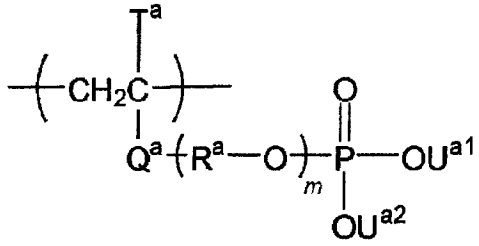
Q^a及Q^b各自獨立代表單鍵、酯鍵或醯胺鍵，Q^c代表單鍵、醚鍵或酯鍵；

R^a及R^b各自獨立代表可經鹵素原子取代之碳原子數1至18之直鏈或支鏈烷基、R^c代表碳原子數1至18之直鏈或支鏈烷基、碳原子數3至10之脂環式烴基、碳原子數6至10之芳基、碳原子數7至15之芳烷基或碳原子數7至15之芳氧烷基(於此，前述芳基部分亦可被可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基取代)；An^-代表選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子以及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子；

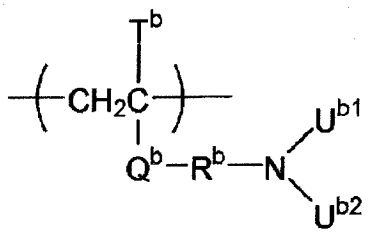
m代表0至6之整數]。因此，由以式(A)、(B)及(C)表

示單體所衍生之重複單位分別以下述式(a1)、(b1)及(c1)：

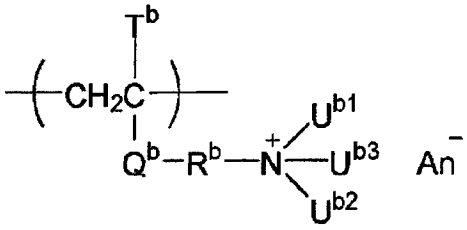
【化10】



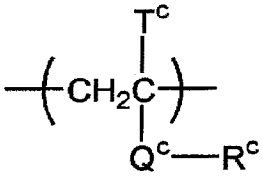
(a1)



或



(b1)



(c1)

(式中，T^a、T^b、T^c、U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}、Q^a、Q^b及Q^c、R^a、R^b及R^c、An^-以及m與上述同義)表示。

【0062】T^a、T^b及T^c，以分別獨立代表氫原子、甲基或乙基為佳，以分別獨立代表氫原子或甲基為較佳。

【0063】U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}，以分別獨立代表氫原子、甲基、乙基或t-丁基為佳。U^{a1}及U^{a2}，以氫原子為較佳。U^{b1}、U^{b2}(以及U^{b3})，以甲基或乙基為較佳，以甲基為特佳。

【0064】Q^a及Q^b，以分別獨立代表酯鍵(-C(=O)-O-或-O-C(=O)-)或醯胺鍵(-NHC(=O)-或-C(=O)NH-)為佳，以分別獨立代表-C(=O)-O-或-C(=O)NH-為較佳，以-C(=O)-O-為特佳。Q^c，以醚鍵或酯鍵(-C(=O)-O-或-O-C(=O)-)為

佳，以-O-或-C(=O)-O-為較佳，以-C(=O)-O-為特佳。

【0065】R^a及R^b，以分別獨立代表可經鹵素原子取代之碳原子數1至3之直鏈或支鏈烷基為佳，以分別獨立代表伸乙基或伸丙基、或者是被一個氯原子取代之伸乙基或者伸丙基為較佳，以伸乙基或伸丙基為特佳。R^c，以碳原子數4至8之直鏈或支鏈烷基或者是碳原子數3至8之脂環式烴基為佳，以碳原子數4至6之直鏈或支鏈烷基或者是碳原子數3至6之脂環式烴基為較佳，以丁基或環己基為特佳。

【0066】作為上述An^-，以鹵化物離子、硫酸離子、磷酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸鹽離子為佳，以鹵化物離子為特佳。

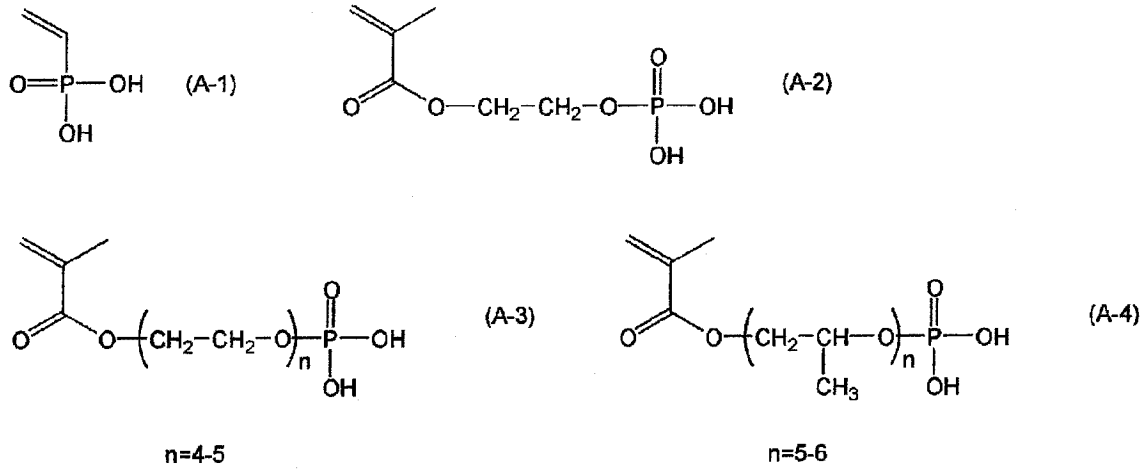
【0067】於式(A)及式(B)，m以代表0至3之整數為佳，以代表1或2之整數為較佳，以1為特佳。

【0068】作為上述式(A)之具體例，可舉出乙烯基膦酸、酸性磷醯氧乙基(甲基)丙烯酸酯、3-氯-2-酸性磷醯氧丙基(甲基)丙烯酸酯、酸性磷醯氧丙基(甲基)丙烯酸酯、酸性磷醯氧甲基(甲基)丙烯酸酯、酸性磷醯氧聚氧乙二醇單(甲基)丙烯酸酯、酸性磷醯氧聚氧丙二醇單(甲基)丙烯酸酯等，但其中以乙烯基膦酸、酸性磷醯氧乙基甲基丙烯酸酯(=磷酸2-(甲基丙烯醯氧基)乙基)適合使用。

【0069】乙烯基膦酸、酸性磷醯氧乙基甲基丙烯酸酯(=磷酸2-(甲基丙烯醯氧)乙基)、酸性磷醯氧聚氧乙二醇單甲基丙烯酸酯及酸性磷醯氧聚氧丙二醇單甲基丙烯酸酯之結構式分別以下述式(A-1)~式(A-4)表示。

【0070】

【化11】



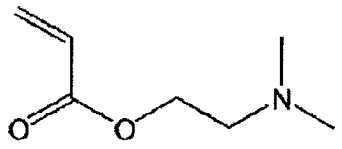
此等化合物在合成時，有時會包含以後述通式(D)或(E)表示之具有兩個官能基的(甲基)丙烯酸酯化合物。

【0071】作為上述式(B)之具體例，可舉出二甲基胺基乙基(甲基)丙烯酸酯、二乙基胺基乙基(甲基)丙烯酸酯、二甲基胺基丙基(甲基)丙烯酸酯、2-(t-丁基胺基)乙基(甲基)丙烯酸酯、氯化甲基丙烯醯基膽鹼等，但其中以二甲基胺基乙基(甲基)丙烯酸酯、氯化甲基丙烯醯基膽鹼或2-(t-丁基胺基)乙基(甲基)丙烯酸酯適合使用。

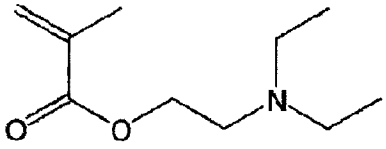
【0072】二甲基胺基乙基丙烯酸酯(=丙烯酸2-(二甲基胺基)乙基)、二乙基胺基乙基甲基丙烯酸酯(=甲基丙烯酸2-(二乙基胺基)乙基)、二甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯(=甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙基)、氯化甲基丙烯醯基膽鹼以及2-(t-丁基胺基)乙基(甲基)丙烯酸酯(=甲基丙烯酸2-(t-丁基胺基)乙基)之結構式分別以下述式(B-1)~式(B-5)表示。

【0073】

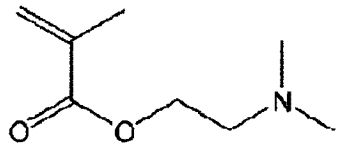
【化１２】



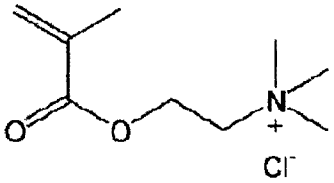
(B-1)



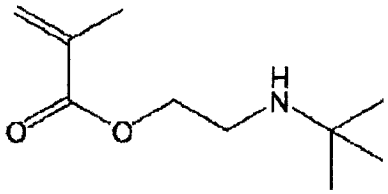
(B-2)



(B-3)



(B-4)



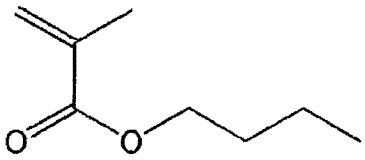
(B-5)

作為上述式(C)之具體例，可舉出丁基(甲基)丙烯酸酯、2-乙基己基(甲基)丙烯酸酯、月桂基(甲基)丙烯酸酯、硬脂基(甲基)丙烯酸酯等(甲基)丙烯酸的直鏈或者支鏈烷基酯類；環己基(甲基)丙烯酸酯、異冰片基(甲基)丙烯酸酯等(甲基)丙烯酸的環狀烷基酯類；苯甲基(甲基)丙烯酸酯、苯乙基(甲基)丙烯酸酯等(甲基)丙烯酸的芳烷基酯類；苯乙烯、甲基苯乙烯、氯甲基苯乙烯等苯乙烯系單體；甲基乙烯基醚、丁基乙烯基醚等乙烯基醚系單體；乙酸乙烯酯、丙酸乙烯酯等乙烯酯系單體。其中又以丁基(甲基)丙烯酸酯或環己基(甲基)丙烯酸酯適合使用。

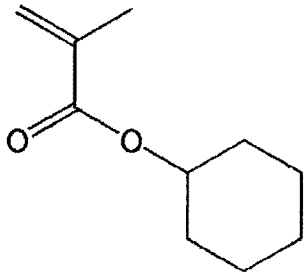
【0074】丁基甲基丙烯酸酯(=甲基丙烯酸丁酯)及環己基甲基丙烯酸酯(=甲基丙烯酸環己酯)之結構式分別以下述式(C-1)及式(C-2)表示。

【0075】

【化１３】



(C-1)



(C-2)

本發明之共聚物中所含有之包含以式(a)表示之基之重複單位(或者是以式(a1)表示之重複單位)的比例為3莫耳%至80莫耳%，以3.5莫耳%至50莫耳%為佳，以4莫耳%至40莫耳%為更佳。再者，本發明之共聚物亦可含有2種以上之包含以式(a)表示之基之重複單位(或者是以式(a1)表示之重複單位)。

【0076】本發明之共聚物中所含有之包含以式(b)表示之基之重複單位(或者是以式(b1)表示之重複單位)的比例為3莫耳%至80莫耳%，以5莫耳%至70莫耳%為佳，以8莫耳%至65莫耳%為更佳。再者，本發明之共聚物亦可含有2種以上之包含以式(b)表示之基之重複單位(或者是以式(b1)表示之重複單位)。

【0077】本發明之共聚物中所含有之包含以式(c)表示之基之重複單位(或者是以式(c1)表示之重複單位)的比例，可為對全部共聚物減去上述式(a)及式(b)之後所剩部分的全部，亦可為減去上述式(a)及式(b)與下述之第4成分的合計比例之後所剩部分，但例如為0莫耳%至90莫耳%，以3莫耳%至88莫耳%為佳，以5莫耳%至87莫耳%為更佳。

再者，本發明之共聚物亦可含有2種以上之包含以式(c)表示之基之重複單位(或者是以式(c1)表示之重複單位)。

【0078】本發明之共聚物中以上述式(a1)、式(b1)及式(c1)表示之重複單位之比例的組合為，

以式(a1)：3莫耳%至80莫耳%，式(b1)：3莫耳%至80莫耳%，式(c1)：0莫耳%至90莫耳%

為佳，

以式(a1)：3.5莫耳%至50莫耳%，式(b1)：5莫耳%至70莫耳%，式(c1)：3莫耳%至88莫耳%

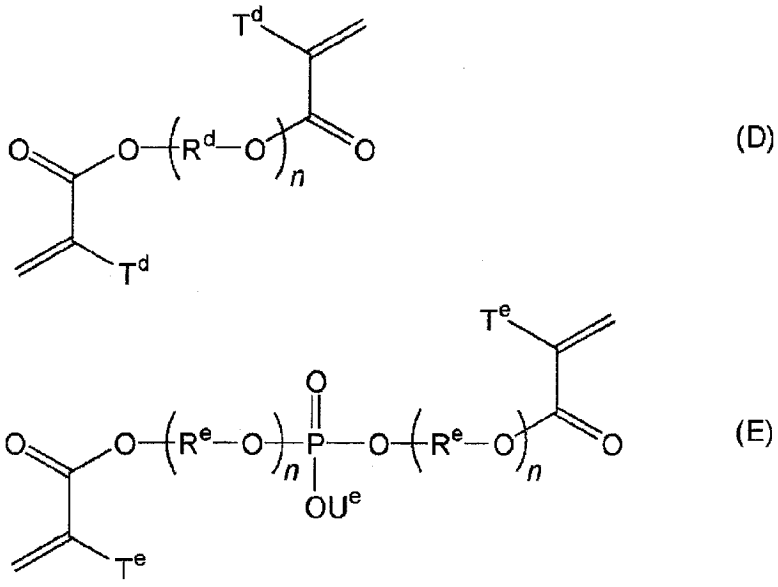
為較佳，

以式(a1)：4莫耳%至40莫耳%，式(b1)：8莫耳%至65莫耳%，式(c1)：5莫耳%至87莫耳%

為更佳。

【0079】此外，本發明之共聚物亦可共聚合任意的第4成分。例如，可作為第4成分而與具有2個以上之官能基之(甲基)丙烯酸酯共聚合，且聚合物的一部分亦可有部分的3次元交聯。作為這樣的第4成分，例如可舉出以下述式(D)或(E)：

【化１４】



(D)

(E)

[式中，T^d、T^e及U^e，分別獨立代表氫原子或碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基，R^d及R^e，分別獨立代表可經鹵素原子取代之碳原子數1至10的直鏈或支鏈烷基；n代表1至6之整數]表示之2官能性單體。即，本發明之共聚物以包含衍生自這種2官能性單體之交聯結構者為佳。

【0080】於式(D)及(E)，T^d及T^e以分別獨立為氫原子、甲基或乙基為佳，以分別獨立為氫原子或甲基為較佳。

【0081】於式(E)，U^e以氫原子、甲基或乙基為佳，以氫原子為較佳。

【0082】於式(D)，R^d以可經鹵素原子取代之碳原子數1至3的直鏈或支鏈烷基為佳，以分別獨立為伸乙基或伸丙基，或者是經1個氯原子取代之伸乙基或伸丙基為較佳，以伸乙基或伸丙基為特佳。此外，於式(D)，n以代表1至5之整數為佳，以1為特佳。

【0083】於式(E)，R^e以可經鹵素原子取代之碳原子數1至3的直鏈或支鏈烷基為佳，以分別獨立為伸乙基或伸丙基，或者是經1個氯原子取代之伸乙基或伸丙基為較佳，以伸乙基或伸丙基為特佳。此外，於式(E)，n以代表1至5之整數為佳，以1為特佳。

【0084】以式(D)表示之2官能性單體，可舉出以乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、三乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、丙二醇二（甲基）丙烯酸酯或來自上述式(A-3)之2官能性單體等。

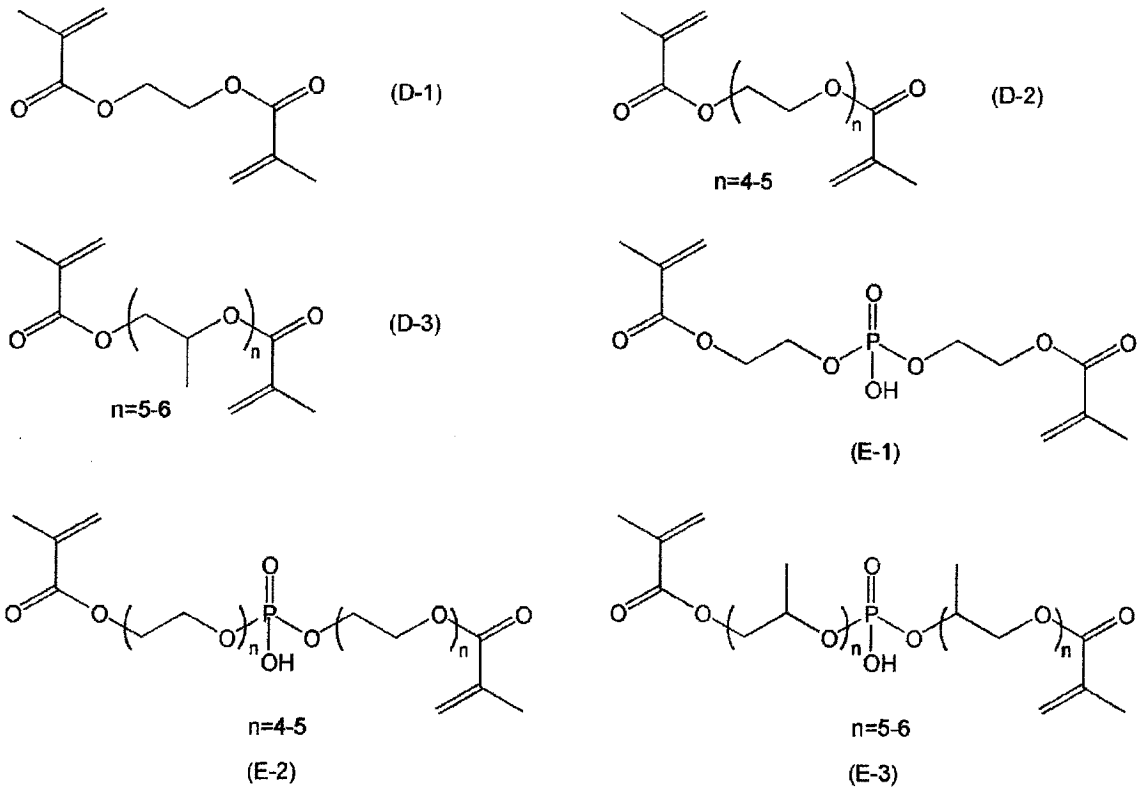
【0085】以式(E)表示之2官能性單體，可舉出以磷酸雙(甲基丙烯醯氧基甲基)、磷酸雙[(2-甲基丙烯醯氧基)乙基]酯、磷酸雙[3-(甲基丙烯醯氧基)丙基]酯或來自上述式(A-3)之2官能性單體。

【0086】任意之第4成分亦可為3官能性單體。作為這樣的第4成分之3官能性單體，例如可舉出三丙烯酸氧次膦基參(氧基-2,1-乙烷二基)酯。

【0087】此等第4成分之中，以乙二醇二甲基丙烯酸酯、來自上述式(A-3)及(A-4)之2官能性單體中具有乙二醇及丙二醇重複單位之二甲基丙烯酸酯、磷酸雙[2-(甲基丙烯醯氧基)乙基]酯，以及來自上述式(A-3)及(A-4)之2官能性單體中藉由磷酸酯基而具有乙二醇及丙二醇重複單位之二甲基丙烯酸酯為特佳，其結構式分別以下述式(D-1)~(D-3)及式(E-1)~(E-3)表示。

【0088】

【化１５】



共聚物中亦可包含1種或2種以上之此等第4成分。

【0089】上述共聚物中的第4成分，例如衍生自以上述式(D)或(E)表示之2官能性單體之交聯結構的比例，為0莫耳%至50莫耳%。

【0090】相對於形成上述共聚物之單體全體，以式(A)表示之化合物的比例為3莫耳%至80莫耳%，以3.5莫耳%至50莫耳%為佳，以4莫耳%至40莫耳%為更佳。而且，以式(A)表示之化合物亦可為2種以上。

【0091】相對於形成上述共聚物之單體全體，以式(B)表示之化合物的比例為3莫耳%至80莫耳%，以5莫耳%至70莫耳%為佳，以8莫耳%至65莫耳%為更佳。而且，以式(B)表示之化合物亦可為2種以上。

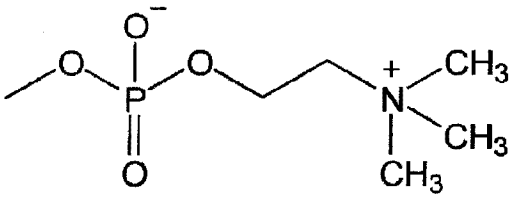
【0092】相對於形成上述共聚物之單體全體，以式(C)表示之化合物的比例可為減去上述式(A)及(B)的比例之後所剩部分的全部，亦可為減去上述式(A)及(B)與上述之第4成分的合計比例之後所剩部分，但例如為0莫耳%至90莫耳%，以3莫耳%至88莫耳%為佳，以5莫耳%至87莫耳%為更佳。而且，以式(C)表示之化合物亦可為2種以上。

【0093】本發明之共聚物，作為任意的第5成分，亦可進一步共聚合乙烯性不飽和單體、或者是多醣類或其衍生物。作為乙烯性不飽和單體之例，可舉出(甲基)丙烯酸及其酯；乙酸乙烯酯；乙烯吡咯啶酮；乙烯；乙烯醇；以及選自由其親水性官能性衍生物所成群之1種或2種以上乙烯性不飽和單體。作為多醣類或其衍生物之例，可舉出羥烷基纖維素(例如，羥乙基纖維素或羥丙基纖維素)等的纖維素系高分子、澱粉、葡聚糖、卡德蘭膠。

【0094】所謂親水性官能性衍生物，意指具有親水性官能基或結構之乙烯性不飽和單體。作為親水性官能基或結構之例，可舉出甜菜鹼結構；醯胺結構；烷二醇殘基；胺基；以及亞磺醯基。

【0095】甜菜鹼結構，意指具有四級銨型的陽離子結構與酸性陰離子結構兩性中心之化合物的一價或二價基，例如可舉出磷醯膽鹼基：

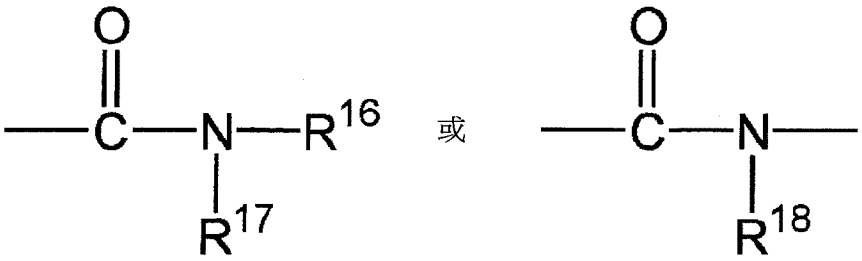
【化16】



。作為具有這種構造的乙烯性不飽和單體之例，可舉出2-甲基丙烯醯氧基乙基磷醯膽鹼(MPC)等。

【0096】醯胺結構，意指以下述式：

【化17】



[於此，R^{16}、R^{17}及R^{18}互相獨立為氫原子或有機基(例如，甲基、羥基甲基或羥基乙基等)]

表示之基。作為具有這種構造的乙烯性不飽和單體之例，可舉出(甲基)丙烯醯胺、N-(羥基甲基)(甲基)丙烯醯胺等。此外，具有這種構造的單體或聚合物，例如，被揭示於日本特開2010-169604號公報等。

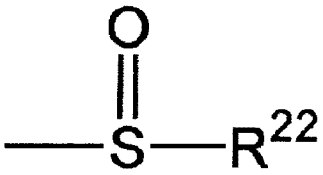
【0097】烷二醇殘基，意指烷二醇(HO-Alk-OH；於此，Alk為碳原子數1至10之伸烷基)的單側末端或兩側末端的羥基與其他化合物進行縮合反應之後剩餘的伸烷氧基(-Alk-O-)，而且也包含伸烷氧基重複之聚(伸烷氧)基。作為具有這種構造的乙烯性不飽和單體之例，可舉出2-羥基

乙基(甲基)丙烯醯胺、甲氧基聚乙二醇(甲基)丙烯醯胺等。此外，具有這種構造的單體或聚合物，例如，被揭示於日本特開2008-533489號公報等。

【0098】胺基，意指以式：$-NH_2$、$-NHR^{19}$或$-NR^{20}R^{21}$[於此，R^{19}、R^{20}及R^{21}互相獨立為有機基(例如，碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基)]表示之基。本發明之胺基中包含經4級化或氯化之胺基。作為具有這種構造的乙烯性不飽和單體之例，可舉出二甲基胺基乙基(甲基)丙烯醯酯、2-(t-丁基胺基)乙基(甲基)丙烯醯酯、甲基丙烯醯氯化膽鹼等。

【0099】亞磺醯基，意指以下述式：

【化18】



[於此，R^{22}為有機基(例如，碳原子數1至10之有機基，以具有1個以上羥基之碳原子數1至10之烷基等為佳)]

表示之基。作為具有這種構造的聚合物，可舉出被揭示於日本特開2014-48278號公報等之共聚物。

【0100】

<共聚物之製造方法>

本發明之共聚物可經由一般丙烯酸聚合物或甲基丙烯酸聚合物等的合成方法之自由基聚合、陰離子聚合、陽離子聚合等方法來合成。其形態可為溶液聚合、懸浮聚合、

乳化聚合、塊狀聚合等種種方法。

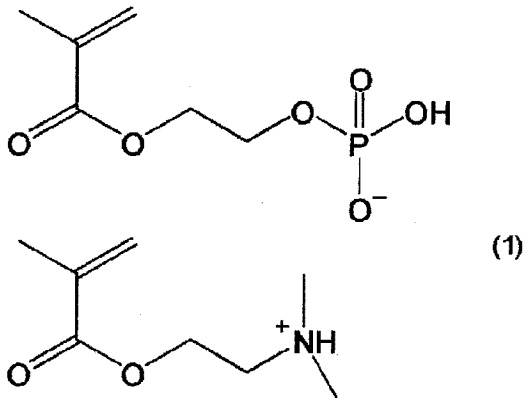
【0101】作為反應用溶劑，可為水、磷酸緩衝液或乙醇等的醇或組合此等之混合溶劑，但以包含水或乙醇為理想。而且以包含水或乙醇10質量%以上100質量%以下為佳。以包含水或乙醇50質量%以上100質量%以下為更佳。以包含水或乙醇80質量%以上100質量%以下為更佳。以包含水或乙醇90質量%以上100質量%以下為更佳。以水與乙醇的合計為100質量%為佳。

【0102】作為反應濃度，例如，包含以上述式(a)表示之基之單體與包含以上述式(b)表示之基之單體，與視情況之包含以上述式(c)表示之基之單體在反應溶劑中的濃度以設在0.01質量%至4質量%為佳。濃度一旦超過4質量%，例如即會有共聚物因以式(a)表示之磷酸基所具有之強締合性而在反應溶劑中凝膠化的情況產生。若濃度不滿0.01質量%，則由於所得到的塗料濃度過低，而使得用以得到充分膜厚之塗覆膜的塗覆膜形成用組成物之製作變得困難。濃度以0.01質量%至3質量%，例如以3質量%或2質量%為較佳。

【0103】於本發明之共聚物之合成，將包含以上述式(a)表示之基之單體與包含以上述式(b)表示之基之單體，製成例如式(1)中所述鹽之後，亦可視情況加入包含以上述式(c)表示之基之單體進行聚合以製作共聚物。

【0104】

【化１９】



(1)

由於含有磷酸基之單體為容易締合之單體，因此在滴入反應系中時，亦可經由能快速分散的方式每次少量地滴入反應溶劑中。此外，為了提高單體及聚合物的溶解性，反應溶劑亦可加熱(例如40℃至100℃)。

【0105】為了有效率地進行聚合反應，以使用聚合開始劑為理想。作為聚合開始劑之例，可使用2,2'-偶氮雙(異丁腈)、2,2'-偶氮雙(2-甲基丁腈)、2,2'-偶氮雙(2,4-二甲基戊腈)(和光純藥工業(股)製；VA-065，10小時半衰期溫度；51℃)、4,4'-偶氮雙(4-氰基戊酸)、2,2'-偶氮雙(4-甲氧基2,4-二甲基戊腈)、1,1'-偶氮雙(環己烷-1-甲腈)、1-[(1-氰基-1-甲基乙基)偶氮]甲醯胺、2,2'-偶氮雙[2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷]、2,2'-偶氮雙(2-甲基丙脒)二鹽酸鹽、2,2'-偶氮雙[2-甲基-N-(2-羥基乙基)丙醯胺](和光純藥工業(股)製；VA-086，10小時半衰期溫度；86℃)、過氧化苯甲醯(BPO)、2,2'-偶氮雙[N-(2-羧基乙基)-2-甲基丙脒]n-水合物(和光純藥工業(股)製；VA-057，10小時半衰期溫度；57℃)、4,4'-偶氮雙(4-氰基戊酸)(和光純藥工業(股)製；V-

501)、2,2'-偶氮雙[2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷]二鹽酸鹽(和光純藥工業(股)製；VA-044，10小時半衰期溫度；44℃)、2,2'-偶氮雙[2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷]二硫酸鹽二水合物(和光純藥工業(股)製；VA-046B，10小時半衰期溫度；46℃)、2,2'-偶氮雙[2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷](和光純藥工業(股)製；VA-061，10小時半衰期溫度；61℃)、2,2'-偶氮雙(2-甲脒基丙烷)二鹽酸鹽(和光純藥工業(股)製；V-50，10小時半衰期溫度；56℃)、過氧二硫酸或t-丁基過氧化氫等，但考慮到離子平衡與對水的溶解性，其中又以使用2,2'-偶氮雙[2-甲基-N-(2-羥基乙基)丙醯胺]、2,2'-偶氮雙[N-(2-羧基乙基)-2-甲基丙脒]n-水合物、4,4'-偶氮雙(4-氰基戊酸)、2,2'-偶氮雙[2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷]二鹽酸鹽、2,2'-偶氮雙[2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷]二硫酸鹽二水合物、2,2'-偶氮雙[2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷]、2,2'-偶氮雙(2-甲脒基丙烷)二鹽酸鹽或過氧二硫酸中的任何一者為理想。

【0106】作為聚合開始劑之添加量，相對於用於聚合之單體的合計重量，為0.05質量%~10質量%。

【0107】反應條件為將反應容器在油浴等之中加熱至50℃至200℃並進行攪拌1小時至48小時，以加熱至80℃至150℃並進行攪拌5小時至30小時為佳，藉此進行聚合反應以得到本發明之共聚物。反應環境以氮環境為佳。作為反應順序，可將全部反應物質加入室溫的反應溶劑中，加熱至上述溫度以使之聚合，亦可將反應物質之混合物的全部或部分一點一點地少量滴入預先加熱好的溶劑中。

【0108】例如，作為後者的反應順序，將包含以上述式(A)、(B)及(C)表示之化合物、溶劑及聚合開始劑之混合物，滴入保持在比該聚合開始劑之10小時半衰期溫度更高的溫度之溶劑中，以使之反應(聚合)。經由採用此反應順序與溫度條件，可將以上述式(A)、(B)或(C)表示之化合物在反應溶劑中的濃度設定在例如0.01質量%至10質量%。在此情況下，即使濃度超過4質量%，在反應前滴入相及反應相為透明均勻之溶液，可抑制反應後之共聚物在反應溶劑中的凝膠化。

【0109】本發明之共聚物的分子量，只要是在數千至數百萬左右即可，以5,000至5,000,000為佳。以10,000至2,000,000為更佳。此外，可為無規共聚物、嵌段共聚物、接枝共聚物的任何一者，用以製造該共聚物之共聚合反應本身無特殊限制，可使用利用自由基聚合或離子聚合或光聚合、乳化聚合之聚合等的在為公眾所知之溶液中合成的方法。此等可視目的用途，單獨使用本發明之共聚物中的任何一者，亦可混合複數的共聚物，並改變其比例使用。

【0110】以這種方式製造之各種共聚物，可為2次元聚合物亦可為3次元聚合物，為分散於含有水之溶液的狀態。即，包含此等聚合物之塗料中，發生不均勻之凝膠化或白濁沉澱者即不佳，以透明的塗料，分散膠體狀的塗料或者是溶膠為佳。

【0111】本發明之細胞培養容器，以容器表面的至少一部份被塗覆上述共聚物為特徵，並以可與細胞及培養液

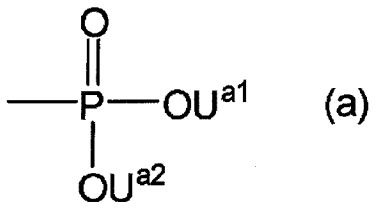
接觸之容器內部表面被塗覆為佳，以容器的表面全體被塗覆為較佳。上述共聚物在細胞培養容器上的塗層，可藉由為公眾所知的手段，具體來說可藉由後述項目<<細胞培養容器之製造方法>>及實施例中所述手段形成。本發明之細胞培養容器之塗層厚度雖可配合容器形狀或目的適當選擇，但以10~1000Å為佳，以10~500Å為較佳，以10~300Å為特佳。本發明之細胞培養容器藉由這樣的塗層而具有優異的對細胞或蛋白質的附著抑制能力。

【0112】

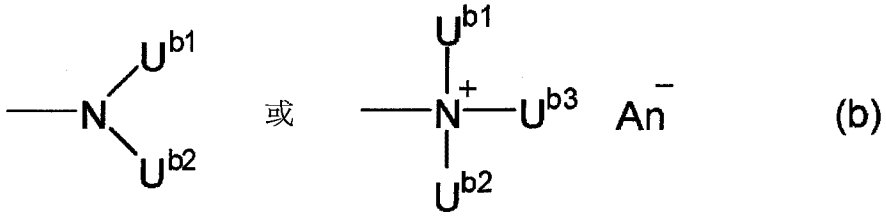
<<細胞培養容器之製造方法>>

本發明之第二態樣為一種製造方法，其為一種包含下述步驟之細胞培養容器製造方法：使塗覆劑接觸具有至少一個容積為20 μL以下之開口微小空間的細胞培養容器表面，並在構成該微小空間之容器表面部分的至少一部分形成最大膜厚與最小膜厚之差為1000Å以下之塗覆膜的步驟，且該塗覆劑包含下述共聚物，該共聚物含有包含以下述式(a)表示之基之重複單位、包含以下述化學式(b)表示之基之重複單位、並以含有包含以化學式(c)表示之基之重複單位為佳：

【化２０】



(a)



(b)

【化２１】



(c)

(式中，U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}、R^c以及An^-與上述同義)。

【0113】

<塗覆步驟>

於本發明之細胞培養容器之製造方法的塗覆步驟，將共聚物塗覆於容器表面部分的至少一部份，該容器表面部分構成開口於容器表面之容積為20 μL以下之微小空間。例如，在容器為圓底多孔培養板的情況下，可僅塗覆孔的凹陷部分，亦可塗覆培養板全體。於此，容器及共聚物分別如前述項目<容器>及<共聚物>中所述。

【0114】塗覆步驟無特殊限制，只要經由可使容器與包含共聚物之塗覆劑接觸之本領域人員眾所周知的任何塗覆手段(例如，塗佈、浸漬等)來實施即可。例如，可經由

將作為塗覆劑包含之共聚物的塗料塗佈於容器，或者是將容器浸漬於作為塗覆劑之包含共聚物的塗料中來實施。以經由將容器浸漬於包含共聚物的塗料中來實施為佳。

【0115】包含共聚物之塗料，可經由以期望的濃度將藉前述項目<共聚物之製造方法>得到之共聚物溶解於適當的溶劑中以調製，或者是亦可將藉此製造方法得到之包含共聚物的反應溶液直接或稀釋至期望的固體成分濃度之後使用作為塗料。作為塗料中所包含之溶劑，可舉出水、磷酸緩衝液(PBS)、醇。作為醇，可舉出碳數2至6之醇，例如乙醇、丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、異丁醇、t-丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、1-庚醇、2-庚醇、2,2-二甲基-1-丙醇(=新戊醇)、2-甲基-1-丙醇、2-甲基-1-丁醇、2-甲基-2-丁醇(=t-戊醇)、3-甲基-1-丁醇、3-甲基-3-戊醇、環戊醇，1-己醇、2-己醇，3-己醇、2,3-二甲基-2-丁醇、3,3-二甲基-1-丁醇、3,3-二甲基-2-丁醇、2-乙基-1-丁醇、2-甲基-1-戊醇、2-甲基-2-戊醇、2-甲基-3-戊醇、3-甲基-1-戊醇、3-甲基-2-戊醇、3-甲基-3-戊醇、4-甲基-1-戊醇、4-甲基-2-戊醇、4-甲基-3-戊醇及環己醇，可單獨使用或使用此等之組合混合溶劑，但以選自水、PBS及乙醇者為佳。為了共聚物之溶解，必須包含水。

【0116】作為塗漆中之共聚物的濃度為0.01至4質量%，以0.01至3質量%為更理想，以0.01至2質量%為更理想，以0.01至1質量%為更理想。共聚物之濃度若不滿0.01質量%，即無法形成膜厚充分之塗層，若超過4質量%，即

有塗漆的保存安定性變差，發生溶解物析出或凝膠化的可能性。

【0117】此外塗漆中除了上述共聚物與溶劑，亦可在不損及所得到之塗層的性能的範圍內配合需要添加其他物質。作為其他物質，可舉出防腐劑、界面活性劑、提高與基材(容器)之密著性的底漆、防黴劑及醣類等。

【0118】為了調節塗漆中之共聚物的離子平衡，亦可預先調整包含共聚物之塗漆的pH。pH調整，例如亦可經由在包含共聚物之塗漆中添加pH調整劑，將塗漆之pH調整到pH3.5~8.5，以4.0~8.0為佳來實施。可使用之pH調整劑之種類及其量可配合塗漆中之共聚物的濃度、共聚物之陰離子與陽離子的存在比等做適當選擇。作為pH調整劑之例，可舉出氨、二乙醇胺、吡啶、N-甲基-D-葡糖胺、參(羥甲基)胺基甲烷等的有機胺；氫氧化鉀、氫氧化鈉等的鹼金屬氫氧化物；氯化鉀、氯化鈉等的鹼金屬鹵化物；硫酸、磷酸、鹽酸、碳酸等的無機酸或其鹼金屬鹽；膽鹼等的四級銨陽離子；或者是此等的混合物(例如，磷酸緩衝生理食鹽水等的緩衝液)。此等之中，又以氨、二乙醇胺、N-甲基-D-葡糖胺、參(羥甲基)胺基甲烷、氫氧化鈉及膽鹼為佳，以氨、二乙醇胺、氫氧化鈉及膽鹼為特佳。

【0119】使這種包含共聚物之塗漆接觸容器，以在表面的至少一部份形成塗層。塗層，以在構成微小空間之容器表面部分的全體形成為佳，以在細胞培養容器的整個表面全體形成為較佳。

【0120】再者，亦可在塗覆步驟之前經由為公眾所知之UV/臭氧處理洗淨容器表面。此洗淨步驟可使用市售之UV/臭氧清淨機等來實施。

【0121】

<乾燥・洗淨・滅菌步驟>

塗覆步驟之後，以在-200℃至200℃的溫度下乾燥經塗覆之容器為佳。藉由乾燥，在去除上述塗覆膜形成用組成物中的溶劑的同時，本發明之共聚物之式(a)及式(b)彼此形成離子鍵而完全固著於基體。本發明之細胞培養容器之塗層的膜厚以10~1000Å為佳，以10~500Å為較佳，以10~300Å為特佳。本發明者群發現，藉由本發明之細胞培養容器的製造方法，無需在高溫下的處理，而是經由低溫下的處理在容器表面形成具有期望之特性的塗層，而且儘管膜厚薄至數十至數百Å左右，其耐久性優異且同時具有優異的對細胞或蛋白質的附著抑制能力。

【0122】乾燥，雖可在例如室溫(10℃至35℃、例如25℃)下實施，但為了更迅速形成塗覆膜，亦可在例如40℃至50℃下實施。而且亦可經由冷凍乾燥法在極低溫~低溫(-200℃至-30℃前後)下實施。冷凍乾燥被稱為真空冷凍乾燥，通常是以冷媒冷卻欲乾燥的東西，並在真空狀態下經由昇華去除溶劑的方法。用於冷凍乾燥的一般冷媒，可舉出混合乾冰與甲醇之介質(-78℃)、液態氮(-196℃)等。乾燥溫度以10℃至180℃為較佳，以25℃至150℃為更佳。

【0123】此外，亦可在乾燥步驟之前及/或之後以乙

醇等碳原子數1至5之醇及/或水洗淨經塗覆之容器表面。該洗淨步驟可在0℃至60℃的溫度下，以25℃(室溫)至40℃為佳的溫度下實施30分鐘至48小時，以實施1至24小時為佳。

【0124】為了去除殘存於該塗層之不純物、未反應單體等，此外為了調節膜中之共聚物的離子平衡，亦可在乾燥步驟之後使用選自由水及包含電解質之水溶液所成群之至少一種溶劑，以流水洗淨或超音波洗淨等進行洗淨。於此，水或包含電解質之水溶液例如亦可為被加熱至40℃至95℃之範圍內者。包含電解質之水溶液，以PBS及生理食鹽水(僅含氯化鈉者)、杜氏磷酸緩衝生理食鹽水、參緩衝生理食鹽水、HEPES緩衝生理食鹽水及巴比妥鈉緩衝生理食鹽水為佳，以PBS為特佳。

【0125】即使以醇、水及PBS等洗淨，在容器表面所形成之塗層也不會溶出而會維持在強力固著於基材(即，容器)的狀態。所形成之塗層具有包含細胞或蛋白質之各種活體物質的附著抑制能力。因此，本發明之細胞培養容器除了抑制細胞或蛋白質之附著，還係對溶劑之耐久性優異者。

【0126】為了將經塗覆之容器滅菌，亦可配合需要實施放射線、電子束、環氧乙烷、高壓釜等為公眾所知之滅菌處理。

【0127】

<<細胞凝集體之製造方法>>

本發明之第三態樣為一種細胞凝集體之製造方法，其特徵為使用本發明之細胞培養容器及經由本發明之製造方法所得到之細胞培養容器(以下，將兩者合稱為「本發明之細胞培養容器」)。若使用本發明之細胞培養容器，由於細胞凝集體對容器表面的附著受到抑制，而且塗層對培養液的溶出受到抑制，因此可在無來自容器之刺激的狀態下培養細胞凝集體。細胞凝集體，以在本發明之細胞培養容器中使用特徵為包含具有使細胞或組織懸浮之效果的多醣類(特別是，脫醯化結蘭膠)的培養基來培養為佳。這種培養基的具體組成和培養方法，例如國際公開第2014/017513號公報中所揭示。

【0128】

(接觸角評價)

作為接觸角評價方法的一個態樣，有以下的方法。

【0129】

[靜態接觸角計之評價]

使用全自動接觸角計(協和界面化學(股)，DM-701)評價已形成塗覆膜之各種基板。評價溫度例如為25℃(大氣中及水中)。靜態接觸角為，除了測定在大氣中水滴之接觸角，還在水中顛倒設置各種基板以進行氣泡之接觸角測定之水中接觸角，並以兩者進行評價。

[實施例]

【0130】以下，基於合成例、實施例、試驗例等更詳

細地說明本發明，但本發明並不被限定於此等。

【0131】下述合成例中所示之共聚物的重量平均分子量為Gel Filtration Chromatography(以下，簡稱為GFC)或Gel Permination Chromatography(以下，簡稱為GPC)之測定結果。測定條件等如下所述。

【0132】

(GFC測定條件)

・設備：Prominence(島津製作所製)

・GFC管柱：TSKgel GMPWXL(7.8 mm I.D.×30cm)×2~3支

・流速：1.0mL/min

・洗提液：含離子性物質水溶液，或者是EtOH混合溶液

・管柱溫度：40℃

・檢測器：RI

・注入濃度：聚合物固體成分0.05~0.5質量%

・注入量：100μL

・校正曲線：三次近似曲線

・標準樣品：聚環氧乙烷(Agilent公司製)×10種

<合成例1>

將甲基丙烯酸酸性膦醯氧基乙酯(製品名；Phosmer M，Uni Chemical(股)製，乾涸法100℃・1小時之不揮發成分：91.8%，甲基丙烯酸酸性膦醯氧基乙酯(44.2質量%)、

磷酸雙[2-(甲基丙烯醯氧基)乙基](28.6質量%)、其他物質(27.2質量%)之混合物)5.00g加入乙醇7.97g和純水23.92g中並攪拌溶解，一邊保持在20℃以下，一邊依序將甲基丙烯酸2-(二甲胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)3.82g、2,2'-偶氮雙[N-(2-羧基乙基)-2-甲基丙脒]n-水合物(製品名；VA-057，和光純藥工業(股)製)0.04g一邊保持在20℃以下一邊加入。將充分攪拌並呈現均一狀態之上述全部材料之混合液導入滴液漏斗。另一方面，另將純水47.84g加入附有冷卻管的3口燒瓶，使其流通氮氣，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。持續維持此狀態，將已導入上述混合液之滴液漏斗設置於三口燒瓶，以一個小時將混合液滴入沸騰液內。滴入後，在24小時維持上述環境的狀態下藉由加熱攪拌而得到固體成分約9.70質量%之含有共聚物的塗漆88.60g。所得到之透明液體以GFC測得之重量平均分子量約為280,000。

【0133】

<調製例1>

在於上述合成例1所得到之含有共聚物的塗漆5.00g中加入純水56.39g、乙醇28.50g、1mol/L氫氧化鈉水溶液(1N)(關東化學(股)製)0.85g並充分攪拌，以調製塗覆劑。pH為7.5。於所得到之塗覆劑中，以1500rpm、60秒旋轉塗佈在下述矽晶圓，並以烘箱在50℃下乾燥24小時。其後，以PBS與純水進行充分洗淨，以得到形成塗覆膜之矽晶圓。以光學式干涉膜厚計確認矽晶圓之塗覆膜膜厚，結果

為55Å。

【0134】

<調製例2>

將聚(2-甲基丙烯酸羥乙酯)(Sigma-Aldrich Japan(股)製)1.2g溶解於乙醇29.98g與純水2g並充分攪拌，以調製塗覆劑。於所得到之塗覆劑中，進行與調製例1同樣之矽晶圓旋轉塗佈，並以烘箱在50℃下乾燥24小時。其後，以純水進行充分洗淨，以在矽晶圓或培養板上得到塗覆膜。以橢圓偏光儀確認矽晶圓之塗覆膜膜厚，結果為1960Å。

【0135】

<實施例1及比較例1：塗覆培養板(聚苯乙烯)之調製>

在Corning #3893(1536孔，容積12.5μL/孔，細胞黏附處理・伽馬射線滅菌處理完成，材質：聚苯乙烯)與Greiner #782180(1536孔，容積12.6μL/孔，細胞黏附處理・伽馬射線滅菌處理完成，材質：聚苯乙烯)中分別將調製例1之塗覆劑3μL注入各孔。使其靜置1小時後，去除，並以烘箱在50℃下乾燥24小時。其後，以10 μL純水分別洗淨經塗覆之孔各3次，以得到實施例1之塗覆培養板。同樣地，在Corning #3893與Greiner #782180，分別將調製例2之塗覆劑3μL注入各孔，並以烘箱在50℃下乾燥24小時，以得到比較例1之塗覆培養板。將此等培養板使用於以下之試驗例1。作為陰性對照，使用未實施塗覆之孔。

【0136】

<試驗例1：細胞附著抑制效果>

(細胞之調製)

細胞，使用小鼠胚胎纖維母細胞C3H10T1/2(DS Pharma Biomedical(股)製)。細胞培養中所使用之培養基，使用包含10% FBS(HyClone公司製)與L-麩醯胺-青黴素-鏈黴素安定化溶液(Sigma-Aldrich公司製)之BME培養基(Thermo Fisher Scientific(股)製)。細胞，係在37℃/CO_2恆溫培養器內保持5%二氧化碳濃度的狀態下，使用直徑10cm之培養盤(培養基10mL)靜置培養兩天以上。接下來，以PBS 5mL洗淨本細胞之後，添加胰蛋白酶-EDTA溶液(Invitrogen公司製)1mL以剝離細胞，並分別懸浮於上述培養基10mL。將本懸浮液離心分離((股)TOMY SEIKO製，型號LC-200，1000rpm/3分鐘，室溫)之後，去除上清液，添加上述之培養基以調製細胞懸浮液。

【0137】

(細胞附著實驗)

以達到100 cells/孔的方式分別對上述實驗例1及比較例1中所調製之各培養板，以及作為陰性對照之未實施本發明之塗覆之培養板，添加細胞懸浮液各5μL。其後，在保持5%二氧化碳濃度的狀態下，在37℃下於CO_2恆溫培養器內靜置4天。

【0138】

(細胞附著的觀察與培養板塗佈性)

培養一天後，以倒立型顯微鏡(Olympus(股)製，

CKX31)的觀察(倍率：4倍)為基礎，比較細胞對實施例1之培養板、比較例1之培養板以及陰性對照之培養板的附著。各培養板的結果(培養一天後)示於圖1~圖6。膜的塗佈性與細胞附著、培養基添加後有無氣泡的相關結果示於表1。

【0139】有關細胞附著抑制，將有細胞附著的情況記載為×，無細胞附著的情況記載為○。有關起泡，添加培養基至孔之後，將沒有觀察到氣泡的情況記載為○，有觀察到氣泡的情況記載為×。有關塗佈性，將在觀察領域內觀察到細胞與氣泡以外之來自塗膜物之圖像的情況當作塗佈不良並記載為×，維持與陰性對象相同圖像的情況記載為○。

【0140】

[表1]

	1536 well plate (Corning公司製)			1536 well plate (Greiner公司製)		
	細胞黏附抑制	起泡	塗佈性	細胞黏附抑制	起泡	塗佈性
陰性對照	×	○	–	×	○	–
實施例1	○	○	○	○	○	○
比較例1	○	×	×	○	○	×

陰性對照培養板雖有觀察到細胞附著但無觀察到起泡。比較例1之培養板雖無觀察到細胞附著但觀察到起泡與塗佈不良。僅可在實施例1確認良好的塗佈性，且無論細胞附著或起泡都沒有觀察到。

【0141】

<實施例2及比較例2：塗覆培養板(PDMS)之調製>

(PDMS塗覆培養板之製作)

製作可轉印圖7之形狀的模具。以SYLGARD 184矽氧烷・彈性體(DOW CORNING公司製)的主劑10.00g與硬化劑1.00g的比例混合・攪拌，並倒入製作好的模具。以減壓泵去除氣泡之後以烘箱在80℃下乾燥1小時。冷卻至室溫之後再將PDMS的硬化物自模具中取出。將硬化物浸漬在純水中，並在120℃下進行60分鐘高壓釜滅菌處理。將Asnol培養盤：φ40×13.5mm(AS ONE製)之底對準圖8之凹穴領域切成20mm見方，以70%乙醇洗淨之後將PDMS硬化物放入培養盤並蓋上。做成具有直徑1mm(凹穴間距離0.3mm)、深度0.5mm、每1個凹穴容積約0.3μL之凹穴數203個的PDMS塗覆培養板(參照圖9)。

【0142】

(PDMS塗覆培養板之調製)

在上述製作好之PDMS塗覆培養板中，分別將調製例1之塗覆劑2mL注入各培養板。將其靜置1小時之後，去除，並以烘箱在50℃下乾燥24小時。其後，以2mL純水分別洗淨經塗覆之培養板各3次，以得到實施例2之塗覆培養板。同樣地，在上述製作好之PDMS塗覆培養板中，分別將調製例2之塗覆劑2mL注入各培養板，並以烘箱在50℃下乾燥24小時，以得到比較例1之塗覆培養板。將此等培養板使用於以下之試驗例2。作為陰性對照，使用未實施塗覆之培養板。

【0143】

<試驗例2：細胞附著抑制效果>

(細胞之調製)

細胞，使用正常人類新生兒包皮皮膚纖維母細胞NHDF(Kurabo(股)製)。細胞培養中所使用之培養基，使用包含10% FBS(Gibco公司製)與青黴素-鏈黴素溶液(Gibco公司製)之D-MEM低葡萄糖培養基(和光純藥工業(股)製)。

【0144】細胞，係在37℃/CO_2恆溫培養器內保持5%二氧化碳濃度的狀態下，使用直徑10cm之培養盤(培養基10mL)靜置培養兩天以上。接下來，以PBS 5mL洗淨本細胞之後，添加胰蛋白酶-EDTA溶液(和光純藥工業(股)製)1mL以剝離細胞，並分別懸浮於上述培養基10mL。將本懸浮液離心分離((股)TOMY SEIKO製，型號LC-200，1270rpm/3分鐘，室溫)之後，去除上清液，添加上述之培養基以調製細胞懸浮液。

【0145】

(細胞附著實驗)

以達到30×10^4cells/mL的方式分別對上述實驗例2及比較例2中所調製之各培養板，以及作為陰性對照之未實施本發明之塗覆之培養板，添加細胞懸浮液各2mL。其後，在保持5%二氧化碳濃度的狀態下，在37℃下於CO_2恆溫培養器內靜置3天。

【0146】

(細胞附著的觀察與培養板塗佈性)

培養一天後，以倒立型顯微鏡((股)Nikon製，

ECLIPSE TS100)的觀察(倍率：4倍、10倍)為基礎，比較細胞對實施例2之培養板、比較例2之培養板以及陰性對照之培養板的附著。各培養板的結果(培養一天後)示於圖10~圖13。膜的塗佈性與細胞附著、培養基添加後有無氣泡的相關結果示於表2。

【0147】有關細胞附著抑制，將有細胞附著的情況或沒有形成球樣物的情況記載為×，無附著且形成近似於圓形之球樣物的情況記載為○。有關起泡，添加培養基至孔之後，將沒有觀察到氣泡的情況記載為○，有觀察到氣泡的情況記載為×。有關塗佈性，將在觀察領域內觀察到細胞與氣泡以外之來自塗膜物之圖像的情況記載為×，維持與陰性對象相同圖像的情況記載為○。

【0148】

[表2]

	PDMS容器		
	細胞黏附抑制 形成球樣物	起泡	塗佈性
陰性對照	×	○	–
實施例2	○	○	○
比較例2	○	×	×

陰性對照培養板雖有觀察到細胞附著但無觀察到起泡(參照[圖11])。可在實施例2觀察到良好的塗佈性，觀察到無細胞附著的良好球樣物，而且也沒有觀察到氣泡(參照[圖12])。此外，比較例2中雖有在一部份的孔形成球樣物，但在一部份的孔產生氣泡，此外還觀察到對孔之塗佈性差而從基板剝離(參照[圖13][圖14])。

[產業上的利用可能性]

【0149】本發明之細胞培養容器的表面的至少一部份被塗覆包含特定基之共聚物。因該塗層抑制細胞或蛋白質附著至容器表面，同時塗層強力固著於容器表面，所以塗層溶出至培養液的抑制獲得改善。因此，本發明之細胞培養容器從可在無來自容器之刺激的狀態下培養細胞凝集體的觀點來看是有利的。

【0150】此外，因即使是具有微小空間之細胞培養容器，仍能形成無起泡等缺點且均勻的薄膜塗層，所以可製造品質安定之細胞培養容器。

201923065
專利案號：107133835

【發明摘要】

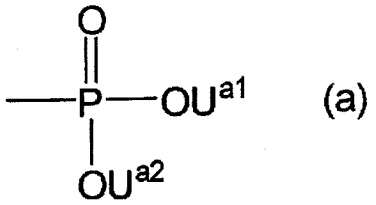
【中文發明名稱】

具有微小容積之細胞培養容器

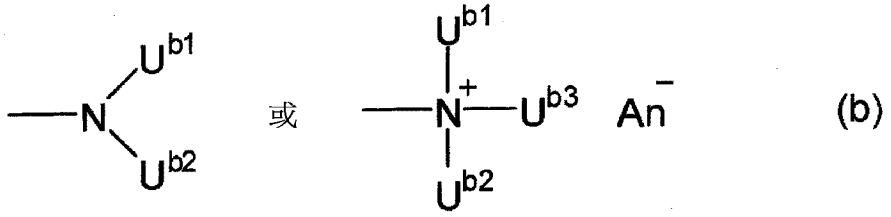
【中文】

本發明係關於一種細胞培養容器、其製造方法以及使用其之細胞凝集體(亦稱為細胞凝集塊)製造方法。本發明特別提供一種以表面塗覆具有細胞附著抑制能力之共聚物為特徵，具有微小容積(20μL以下)之細胞培養容器及其製造方法。

本發明做成一種細胞培養容器，其在容器表面的至少一部份具備包含下述共聚物之塗覆膜，該共聚物含有包含以下述式(a)表示之基之重複單位與包含以下述式(b)表示之基之重複單位：



(a)



(b)

(式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}各自獨立代表氫原子或碳

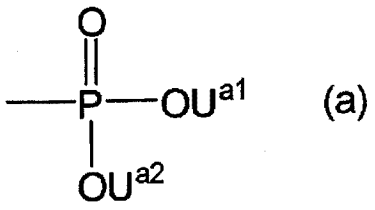
原子數1至5的直鏈或支鏈烷基，An^-代表選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子以及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子)

，且形成該容器之容積為20 μL以下。

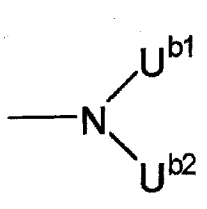
【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

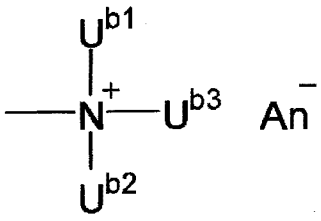
【特徵化學式】



(a)



或



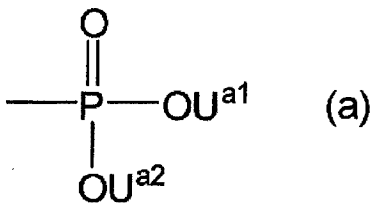
(b)

【發明申請專利範圍】

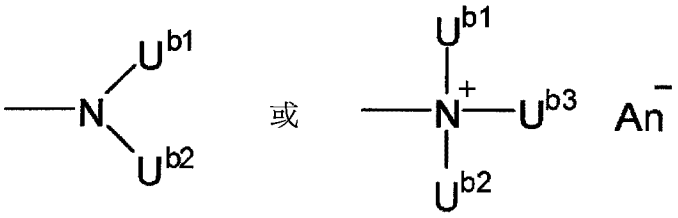
【第1項】

一種細胞培養容器，其容器表面具有至少一個容積為20 μL以下之開口的微小空間，而且其在構成該微小空間之容器的表面部分的至少一部份具備包含下述共聚物之塗覆膜，該共聚物含有包含以下述式(a)表示之基之重複單位與包含以下述式(b)表示之基之重複單位：

【化1】



(a)



(b)

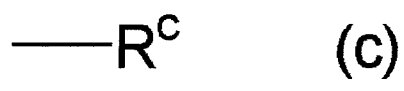
(式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}各自獨立代表氫原子或碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基，An^-代表選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子以及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子)。

【第2項】

如第1項之細胞培養容器，其中上述共聚物更進一步含有包含以下述式(c)：

【化2】



[式中，

R^c代表碳原子數1至18之直鏈或支鏈烷基、碳原子數3至10之環式烴基、碳原子數6至10之芳基、碳原子數7至15之芳烷基或碳原子數7至15之芳氧烷基(於此，前述芳基部分亦可被可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基取代)]表示之基之重複單位。

【第3項】

如第1項或第2項之細胞培養容器，其中上述塗覆膜的最大膜厚與最小膜厚之差為1000Å以下。

【第4項】

如第1項~第3項中任一項之細胞培養容器，其為細胞凝集體製造用。

【第5項】

如第1項~第4項中任一項之細胞培養容器，其中上述塗覆膜表面在大氣中的水接觸角為0~120°，或者是在水中的氣泡接觸角為80~180°。

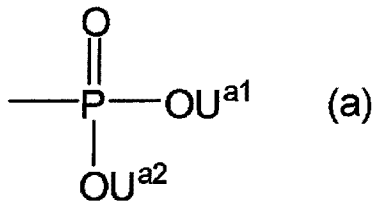
【第6項】

一種製造方法，其為一種包含下述步驟之細胞培養容器製造方法：使塗覆劑接觸具有至少一個容積為20 μL以下之開口的微小空間的細胞培養容器表面，並在構成該微小空間之容器的表面部分的至少一部分形成最大膜厚與最

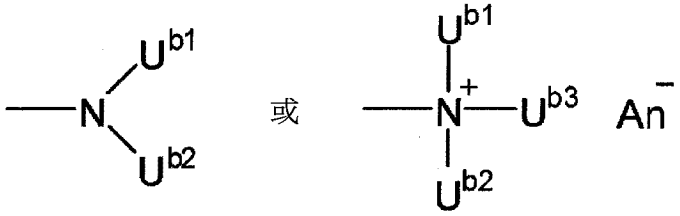
小膜厚之差為1000Å以下之塗覆膜的步驟，

且上述塗覆劑包含下述共聚物，該共聚物含有包含以下述式(a)表示之基之重複單位與包含以下述化學式(b)表示之基之重複單位：

【化3】



(a)



(b)

(式中，

U^{a1}、U^{a2}、U^{b1}、U^{b2}以及U^{b3}各自獨立代表氫原子或碳原子數1至5的直鏈或支鏈烷基，An^-代表選自由鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子以及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子)。

【第7項】

如第6項之細胞培養容器製造方法，其中上述共聚物更進一步含有包含以下述式(c)：

【化4】



(c)

[式中，

R^c代表碳原子數1至18之直鏈或支鏈烷基、碳原子數3至10之環式烴基、碳原子數6至10之芳基、碳原子數7至15之芳烷基或碳原子數7至15之芳氧烷基(於此，前述芳基部分亦可被可經鹵素原子取代之碳原子數1至5之直鏈或支鏈烷基取代)]表示之基之重複單位。

【第8項】

如第1項~第5項中任一項之細胞培養容器，其可見光區域的穿透率為90%以上。

【第9項】

如第1項~第5項中任一項之細胞培養容器，其材質為玻璃、含金屬化合物、含半金屬化合物或樹脂。